

ヒストンアルギニンメチル化酵素の生体内高次機能の解析)

著者	木村 周平
号	78
学位授与番号	2661
URL	http://hdl.handle.net/10097/45887

氏 名（本籍）	木 ^き 村 ^{むら} 周 ^{しゅう} 平 ^{へい}
学 位 の 種 類	博 士（医 学）
学 位 記 番 号	医 博 第 2 6 6 1 号
学位授与年月日	平 成 21 年 3 月 25 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 専 攻	東北大学大学院医学系研究科 （博士課程）医科学専攻
学 位 論 文 題 目	ヒストンアルギニンメチル化酵素の生体内高次機能の解析

	(主 査)
論 文 審 査 委 員	教授 八重樫 伸 生 教授 五十嵐 和 彦 教授 中 山 啓 子

論文内容要旨

〈背景〉

真核生物における遺伝子発現制御は、DNA 結合性の転写制御因子と、ヒストン修飾酵素や ATP 依存性クロマチンリモデリング因子等の転写共役因子との協調的な作用によるクロマチン構造変換を介して行われる。真核生物の DNA はヒストン H2A, H2B, H3, H4 の各二分子ずつから成るヒストン八量体に巻き付いたヌクレオソーム構造を基本単位として、更にリンカーヒストンや非ヒストンタンパク質の関与により高度に折り畳まれたクロマチン構造を形成する。ヒストン N 末端領域のヒストンテールは、その特定のアミノ酸残基において、アセチル化、メチル化、リン酸化、ユビキチン化等の共有結合修飾を受け、これらの修飾により、遺伝子発現が正もしくは負に調節される。様々なヒストン翻訳後修飾の中でも本研究で着目するヒストンアルギニン残基のメチル化は PRMT (Protein arginine methyltransferase) ファミリータンパク質により触媒され、その中でも CARM1 (Coactivator-associated arginine methyltransferase 1) はヒストン H3 の第十七番目のアルギニン残基をメチル化し、PRMT1 はヒストン H4 の第三番目のアルギニン残基をメチル化し、それぞれ転写を活性化する。

〈問題点・目的〉

今までのヒストンアルギニンメチル化酵素の転写制御における解析は、*in vitro* アッセイや培養細胞での解析が中心であった。さらに、機能欠失マウスが報告がされているが、ほとんどが胎生致死である。そのため、個体内での作用に関しては詳細な機能があまりよくわかっていない。

〈方法〉

そこで、本研究では、遺伝学的手法に優れたショウジョウバエで機能欠失変異体を作成することにより、生体内でのアルギニンメチル化酵素の転写制御メカニズムを明らかにする事を目的とする。

〈結果〉

まず、哺乳類の PRMT1 のショウジョウバエモホログである DART1 (*Drosophila* arginine methyltransferase 1) がヒストン H4 の第三番目のアルギニン残基のメチル化活性を持つことを確認した。そして、いまだ報告がない *dart1* 遺伝子の機能欠失変異体を作成した。その変異体を *dart1*⁵⁰ と名付けた。*dart1*⁵⁰ 変異体は、蛹までは野生型と同じように発生が進むが、蛹の時期に生存率が低下し、かつ発生が遅延することを見いだした。

この表現型と、多くのヒストン修飾酵素が核内レセプターと協調的に働くという報告から、DART1と昆虫の発生に重要である事が知られている核内レセプターである EcR (Ecdysone receptor) との間に関連があるかどうかを調べた。その結果、培養細胞で、EcR と DART1 はリガンド依存的に相互作用し、さらに DART1 はエクダイソンホルモンによる EcR の転写活性化を抑制することが明らかとなった。また、これらの培養細胞の実験結果と一致して、EcR の結合エレメントをレポーターの上流につなげたショウジョウバエと DART1 の変異体のショウジョウバエを掛け合わせたところ、野生型に比べレポーターの発現量が上昇していた。

これらの結果から DART1 はショウジョウバエ生体内で、リガンド依存的な EcR の転写活性化を抑制し、蛹の時期の発生に重要な働きを持つ可能性が示唆された。既知の報告のようにアルギニンメチル化酵素が必ずしも転写の活性化ではなく、生体内では転写の抑制に働く事があることが示唆された。また、今回作出した dart1⁵⁰ 変異体はヒストン修飾酵素の生体内での機能を解析する上で、今後強力なツールになることが期待される。

審査結果の要旨

ヒストンのアルギニンメチル化修飾はクロマチン構造を規定することにより、遺伝子発現を制御するエピジェネティックなマーカーである。また、転写制御という観点からは、アルギニンメチル化酵素は転写共役因子として機能することが明らかにされている。しかし他の転写共役因子と異なり、アルギニンメチル化酵素の生体内での生理学的な機能はほとんどわかっていない。そこで、本研究では遺伝学的手法に優れたショウジョウバエを用い、アルギニンメチル化酵素の生体内での解析を試みた。まず、哺乳類の PRMT1 タンパク質のホモログである DART1 タンパク質はヒストン H4 の第三番目のアルギニン残基をメチル化することを示した。さらに、インブリサイス P 因子エクシジション法により、いまだ報告のない *dart1* 遺伝子の変異体ショウジョウバエを作出した。その結果、変異体は蛹の時期に生存率が低下し、かつ発生が遅延するという表現型を示した。ただし、変異体でヒストン修飾への変化が認められなかった。また、変異体で蛹の時期に観察された表現型が、エクダイソンホルモンシグナルの異常によるものかどうかを解析した。その結果、*in vitro*, *in vivo* において、DART1 がエクダイソンホルモン依存的に核内レセプターの EcR と相互作用し、EcR の転写活性化を抑制することが明らかとなった。また、変異体では EcR の標的遺伝子の中でも *ecr* 遺伝子の発現が異常に上昇していた。これらの結果から、ヒストンアルギニンメチル化酵素である DART1 が EcR の転写活性化を抑制し、ショウジョウバエ生体内で蛹の時期の脱皮、変態に重要な役割を果たすことが示唆された。また、結果から導かれたモデル図に対し十分考察し、さらにショウジョウバエをモデル生物として、ヒトの病態解明に対する応用の可能性を展望として述べた。以上の研究によりヒストンアルギニンメチル化酵素 DART1 の生体内高次機能の理解が進んだと言える。また、特にアルギニンメチル化酵素のみならず、転写共役因子群の組織時期特異的な転写制御機能という大きな課題に対し、一つの知見を与えるものである。さらに、モデル生物としてショウジョウバエを用いた研究は、哺乳類研究の手技的な限界を乗り越えることができるため、そこから得られた知見により、将来医学への多大な貢献が期待される。また、審査では、審査委員の質問に対しの確な返答をし、建設的な討論を行い、かつ博士論文は規定の体裁を十分満たしている。

よって、本論文は博士（医学）の学位論文として合格と認める。